12a-羟基鱼藤酮对斜纹夜蛾生殖力的影响及其作用机理

李有志[1]，杨海君[1]，徐汉虹[2]，刘仲华[3]，高必达[1,*]，张瑞峰[2]，周志成[4]
（1. 湖南农业大学生物安全科学技术学院，长沙 410128；2. 华南农业大学农药与化学生物学教育部重点实验室，广州 510642；3. 湖南农业大学茶学教育部重点实验室，长沙 410128；4. 湖南省烟草公司，长沙 410007）

摘要：为探讨12a-羟基鱼藤酮对斜纹夜蛾 *Prodenia litura* (Fabricius)生殖力的影响及其作用机理，本文测定了该虫取食12a-羟基鱼藤酮后的产卵量。在用高效液相色谱仪确定其卵巢组织中存在12a-羟基鱼藤酮后，通过MTT法测定该化合物对斜纹夜蛾卵巢细胞(PL细胞)的细胞毒性,并利用流式细胞仪检测该化合物对PL细胞细胞周期、膜电位、胞内钙离子浓度、线粒体膜电位的影响。结果表明:斜纹夜蛾幼虫取食12a-羟基鱼藤酮后产卵量下降80%以上，并从卵巢组织中检测出该化合物。12a-羟基鱼藤酮对PL细胞增殖具有抑制活性，其IC_{50}为6.6 mg/L。该化合物将PL细胞周期阻滞于S期，导致PL细胞膜电位、线粒体膜电位和细胞内游离钙离子浓度均显著升高。该化合物导致斜纹夜蛾繁殖力降低。12a-羟基鱼藤酮将PL细胞增殖阻滞于细胞周期的S期。同时，该化合物对卵巢细胞具有较弱的毒杀活性，导致一些卵巢细胞死亡。由于上述原因，卵巢细胞数量逐渐减少而导致卵巢管萎缩。卵巢管的萎缩使卵巢管内的卵母细胞不能发育成卵细胞，故其生殖力下降。

关键词：斜纹夜蛾；12a-羟基鱼藤酮；繁殖力；细胞毒性；细胞周期；钙离子浓度；线粒体膜电位

中图分类号：Q965.9　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2009)03-0267-07

Effect of 12a-hydroxyrotenone on the fecundity of *Prodenia litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) and its mechanisms

LI You-Zhi[1], YANG Hai-Jun[1], XU Han-Hong[2], LIU Zhong-Hua[3], GAO Bi-Da[1,*], ZHANG Rui-Feng[2], ZHOU Zhi-Cheng[4] (1. College of Bio-Safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Key Laboratory of Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 3. Key Laboratory of Tea Science of Ministry of Education, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 4. Hunan Tobacco Company, Changsha 410007, China)

Abstract: In order to study the effect of 12a-hydroxyrotenone on the fecundity of *Prodenia litura* (Fabricius) and its action mechanisms, the number of eggs laid per female adult of *P. litura* was investigated; after 12a-hydroxyrotenone in ovary was determined with HLPC, its cytotoxicity to ovarian cells from *P. litura* (PL cells) was determined at 48 h after treatment by MTT assay. The effect of 12a-hydroxyrotenone on cell cycle, cell membrane potential and mitochondrial membrane potential of PL cells, and intracellular free calcium concentration in PL cells at 24 h after treatment was also tested by flow cytometry. The results showed that the number of eggs laid per female adult declined by above 80% after 12a-hydroxyrotenone was fed to *P. litura* larvae, and the compound could be detected from the ovarian tissues. 12a-hydroxyrotenone showed inhibitory activity to PL cells, with IC_{50} being 6.6 mg/L at 48 h after exposure. After PL cells were treated with 12a-hydroxyrotenone for 24 h, the percentage of S phase cells markedly increased in cultured PL cells ($P<0.05$), while the percentage of G_2-M phase cells decreased. Cell membrane potential, mitochondrial membrane potential and the

基金项目:国家自然科学基金项目(30571235)

作者简介:李有志，男，1970年生，湖南常德人，博士，副教授，主要从事植物源杀虫成分研究，E-mail: liyouzhi2008@sina.com
通讯作者 Author for correspondence, Tel.: 0731-4618163; E-mail: bdgao@yahoo.com.cn

收稿日期 Received:2008-12-07；接受日期 Accepted:2009-02-15

intracellular free calcium concentration in PL cells were significantly higher than those of the control groups. 12a-hydroxyrotenone led to a linear decrease in the number of eggs laid per female and PL cell cycle arrest in S phase. 12a-hydroxyrotenone exhibited weak cytotoxicity to PL cells, and caused some of them to death. Thus the number of ovarian cells decreased, and the ovary development was inhibited so that ovarian cells could not develop into mature ooctyes and its fecundity obviously decreased.

Key words: *Prodenia* litura; 12a-hydroxyrotenone; fecundity; cytotoxicity; cell cycle; intracellular free calcium concentration; mitochondrial membrane potential

斜纹夜蛾 *Prodenia litura*（Fabricius）属鳞翅目夜蛾科害虫。由于该虫食性广、繁殖力强，易暴发为害多种农作物，常给农作物生产造成较大的损失。目前，对该虫的防治主要是化学药剂防治，而化学药剂防治易造成农药残留超标和污染农田生态环境。因此，一些研究者（Ben Jannet *et al.*, 2000; Coll and Tandrón, 2005）试图通过生物防治措施或从植物中获得活性成分来防治该虫，以期降低农药残留，延缓害虫抗性的产生。在前期研究中，我们发现植物源化合物12a-羟基鱼藤酮虽然对斜纹夜蛾幼虫的毒杀活性不高，但能导致其卵巢萎缩、产卵量显著降低。随后从该虫卵巢组织中检测出12-a羟基鱼藤酮，这表明该化合物导致斜纹夜蛾生殖力降低，可能是由于该化合物导致卵巢萎缩的结果而不是营养恶化的结果。尽管有关外源化合物或寄主植物等影响昆虫繁殖力的文献较多（沈慧敏和张心虎，2002；李亚等，2007；宋增民等，2007），但迄今为止，12a-羟基鱼藤酮导致斜纹夜蛾生殖力降低及其作用机理尚无文献报道。

近年来，随着生物活性评价模型的完善及其实验技术的进步，通过细胞模型探讨活性成分作用机理的研究日益受到重视（王玉建等，2007；张瑞峰等，2007）。现代流式细胞术结合单克隆抗体技术、定量细胞化学和定量荧光细胞化学的应用后，使其在生物学、临床医学、药物学领域的应用有了较快的发展（管增伟等，2000；蔡真和林茂芳，2001；刘祯等，2003；何俊等，2004；Himeji *et al.*, 2007），但在昆虫毒理和农药研发领域，特别是在国内，应用还较少。因此，本文试图借助流式细胞术等研究12a-羟基鱼藤酮对斜纹夜蛾卵巢细胞（PL细胞）的影响，探讨其作用机理，以期为探讨将该化合物及其衍生物开发成破坏斜纹夜蛾卵巢系统的不育剂提供依据。

1 材料与方法

1.1 生物材料

供试昆虫：斜纹夜蛾卵块采自长沙市郊区的芋头叶片上，其幼虫饲料为甘蓝。PL细胞系：为斜纹夜蛾卵巢细胞系，培养基为Grace昆虫细胞培养基，并添加8%的新生牛血清；27.5℃恒温培养。

1.2 仪器和试剂

FACS Calibur 流式细胞仪，美国 Becton-Dickinson公司制造；680型酶标仪，美国Bio-Rad公司生产；高效液相色谱仪（SPD-20A紫外可见光检测器），岛津公司生产；碘化丙啶（propidium iodide, PI），Sigma公司提供；异硫氰酸荧光素（fluorescence isothiocyanate, FITC），美国 Sigma 公司提供；DiBAC4(3)［biss-(1,3dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol］，美国Molecular Probe公司生产；罗丹明$_{123}$，普博公司生产。

1.3 斜纹夜蛾雌虫产卵量的测定

共设3个处理，剂量分别为50 μg/头、25 μg/头和空白对照。制作夹毒叶碟饲喂发育一致的3龄初幼虫，每处理100～150头虫。喂毒后用无毒甘蓝叶片继续单头饲养，直至其羽化。将配对的斜纹夜蛾成虫置于养虫笼内，笼内悬挂粘有10%蜂蜜水的棉球供其补充营养，并在笼内放置盆栽甘蓝供其产卵，每天收集卵块。另外，在饲养中观察幼虫是否死亡。

解剖产卵后死亡的雌虫，观察其交配囊内有无精包，如有精包，则判断其交配成功，然后统计其卵块孵化后的幼虫数，即为每头雌虫的产卵量。

1.4 卵巢组织中12a-羟基鱼藤酮的检测

参考刘约权等（1998）。药剂处理同1.3。取卵巢管10条，用水冲洗3次后用5 mL氯仿匀浆，10 000 rpm离心5 min，取上清液中的氯仿层。检测条件为碳18反相柱（长250 mm×直径4.6 mm，填料粒径5 μm）；流动相为乙腈和水，其比例分别为75:25，68:32和60:40；检测波长为287 nm。在标

准品的保留时间处，观察提取液是否有独立的峰及在样品中加入标准品后峰面积是否变化来确定卵巢组织中是否含有该化合物。

1.5 PI 染色法测定细胞周期

参考王铭维等(2005)和 Lu 等(2007)。用丙酮将供试化合物溶解后用三蒸水稀释，丙酮的终浓度为 2.5%。取对数生长期的 PL 细胞接种于培养板内。24 h 后，每孔加入 100 μL 药剂，孵育 24 h。800 rpm 离心 5 min。用预冷的 70% 乙醇固定细胞后，用 PBS 洗涤 2 次，加入 200 μL PI(40 μg/mL)染液，室温下避光孵育 30 min，然后上机分析。

1.6 细胞膜电位测定

参考王铭维等(2005)方法。药液配制和细胞处理同 1.5；离心收集细胞，以 PBS 洗涤细胞 2 次，离心后弃 PBS，加入 10 μmol/L 的 DiBAC4 染液 200 μL (5.3861 μg/L)，在 37℃避光染色 20 min，加入 600 μL PBS，上机检测。

1.7 细胞内 Ca^{2+} 浓度测定

参考金春华和赵克森(1999)：药液配制和细胞处理同 1.5。细胞收获后 800 rpm 离心 5min，D-Hank's 液洗涤细胞 2 次，加入 200 μL 终浓度为 11.298 μg/L 的 Fluo-3/AM，室温下避光孵育 30 min，以 Hank's 液洗涤细胞 2 次，最后以 700 μL 的 PBS 悬浮细胞，上机测定。

1.8 线粒体膜电位的测定

参考李云鹏等(2005)：药液配制和细胞处理同 1.5。离心去上清液后用预冷的 PBS 洗涤 3 次，以去除含有血清的培养基；分别向各个试管内加入终浓度为 4.79 mg/L 的罗丹明$_{123}$，室温下闭光孵育 30 min；离心去上清液，用预冷的 PBS 洗涤 3 次后用 PBS 重悬细胞；上机用 FL_1 检测。

1.9 12a-羟基鱼藤酮对斜纹夜蛾卵巢细胞的毒力测定

药液配制同 1.5。称取 3 g SDS 溶于 100 mL 异丙醇中，用 HCl 调节 pH 值至 4.5 后配制溶剂 A，置4℃冰箱中备用。以 MTT 法测定细胞增殖抑制率(王铭维等，2005；Himeji *et al.*，2007；王玉建等，2007)：取对数生长期的 PL 细胞接种于培养板内。24 h 后，每孔加入 100 μL 药剂后再孵育 48 h。在孵育结束前 4 h 每孔加入 10 μL MTT(5 mg/L)。4 h后以溶剂 A 溶解沉淀，在酶标仪上测定 OD_{575}值。

1.10 数据统计与分析

利用 DPS 软件(唐启义和冯明光，2002)统计分析数据。具体是通过机率分析拟合毒力回归方程后，计算抑制中浓度(IC_{50}值)；多重比较是利用新复极差法；两组数据差异显著性测定通过 *t* 测验。

2 结果与分析

2.1 12a-羟基鱼藤酮对幼虫存活和成虫产卵量的影响

12a-羟基鱼藤酮对斜纹夜蛾幼虫没有表现出毒杀活性，即死亡率为 0。和对照相比，斜纹夜蛾幼虫取食 12a-羟基鱼藤酮后，每雌产卵量显著下降(表 1)。根据其相对比值计算可知，处理组的产卵量下降了 80% 以上。这表明，斜纹夜蛾在幼虫期取食该化合物后其成虫生殖力显著下降。

表 1 12a-羟基鱼藤酮对斜纹夜蛾产卵量的影响
Table 1 Effect of 12a-hydroxyrotenone on the number of eggs laid per female adult of *Prodenia litura*

剂量(μg /虫) Dosage (μg/moth)	每雌产卵量 Eggs/♀	相对比值 Ratio
50	27.6 ±4.2 b	0.175
25	28.7 ±2.1 b	0.182
CK	157.3 ±4.6 a	1

表中每雌产卵量数据为平均值 ± *SE*；数据后不同字母表示不同处理在 $P<0.05$ 水平差异显著(DMRT)。Data of the mumber of eggs laid per female in the table were mean ± *SE* and those within a column followed by different letters are significantly different at the 5% level (DMRT).

2.2 卵巢组织中 12a-羟基鱼藤酮的检测

经测定，当流动相(乙腈:水)的比例为 75:25 时，标准品的保留时间为 3.742 min。在相同条件下检测卵巢组织提取物时，在标准品保留时间处有一独立的小峰(图 1)。当调整流动相(乙腈:水)的比例为 68:32 和 60:40 时，在标准品相应的保留时间(3.211 和 5.276 min)处也有对应的独立峰。另外，在流动相(乙腈:水) 为 68:32 时，通过向卵巢组织提取物中添加标样后，在保留时间 3.742 min 处峰面积明显增大。据此可定性确定卵巢组织中含有 12a-羟基鱼藤酮。这表明斜纹夜蛾幼虫取食 12a-羟基鱼藤酮后，在该化合物从消化系统进入血液循环系统后到达卵巢组织的过程中，尽管其间要多次穿过多种组织和生物膜，部分该化合物可能会被多种酶系分解或被脂肪体等吸收，但仍有部分该化合物到达卵巢组织中。

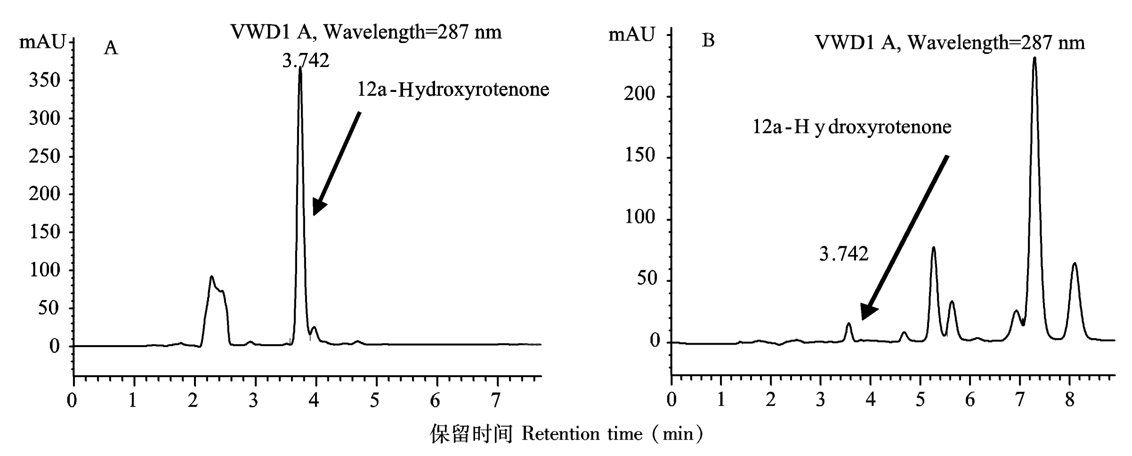


图 1 斜纹夜蛾卵巢组织中 12a-羟基鱼藤酮的定性检测

Fig. 1 Detection of 12a-hydroxyrotenone extracted from the ovarian tissue of *Prodenia litura*

A:标准样品 Standard sauple; B:卵巢组织提取物 Ovarian tissue extract.

2.3 12a-羟基鱼藤酮对 PL 细胞的毒力

从表 2 可知，12a-羟基鱼藤酮对 PL 细胞 48 h 的 IC_{50}值为 6.6 mg/L。这表明该化合物对 PL 细胞增殖具有一定的抑制活性。

表 2 12a-羟基鱼藤酮处理斜纹夜蛾卵巢细胞 48 h 后的细胞毒力

Table 2 Cytotoxicity of 12a-hydroxyrotenone to ovarian cells from *Prodenia litura* (PL cells) at 48 h after treatment

毒力回归方程 Toxicity regression equation	IC_{50} (95% CL) (mg/L)	卡方值 χ^2
$y = 3.738 + (1.536 \pm 0.324)x$	6.6(4.8 - 10.1)	0.9958

2.4 12a-羟基鱼藤酮对 PL 细胞细胞周期的影响

不同浓度的 12a-羟基鱼藤酮处理 PL 细胞 24 h 后，不同时相细胞的百分比发生变化(表 3)。*t* 测验结果表明，不同浓度 12a-羟基鱼藤酮处理后的 S 期单独和对照组 S 期比较，经 12a-羟基鱼藤酮处理后 S 期的细胞数显著高于对照($P<0.05$)。这表明该化合物对细胞周期的影响是将细胞分裂阻滞于 S 期。

2.5 12a-羟基鱼藤酮对 PL 细胞胞内钙离子浓度的影响

Fluo-3 是测定细胞内游离 Ca^{2+} 常用荧光探针之一，它对细胞内游离 Ca^{2+} 有特异性亲和力。Fluo-3 本身不能透过细胞膜进入细胞内，但它和乙酰甲酯(acetoxymethy ester, AM)连接后易被导入细胞内。进入胞内的 Fluo-3/AM 很快又被胞内脂酶水解成 Fluo-3 并和胞内游离 Ca^{2+} 结合。通过流式细胞仪以 488 nm 的亚离子激光发射，可在 525 nm 处检测 Fluo-3 和钙离子复合体因受激发而发射的荧光，而游离的 Fluo-3/AM 受激发后基本不发荧光。因此，胞内荧光强度值可指示胞内 Ca^{2+} 浓度，即荧光强度值表示胞内游离 Ca^{2+} 浓度的相对值。

根据流式细胞仪检测原理并结合表 4 的数据可知，不同浓度的 12a-羟基鱼藤酮处理 PL 细胞后，细胞内游离 Ca^{2+} 浓度都显著高于对照。随着 12a-羟基鱼藤酮浓度的升高，胞内 Ca^{2+} 浓度先升后降，如 12a-羟基鱼藤酮在浓度为 16.675 mg/L 时，Ca^{2+} 浓度为最高值；12a-羟基鱼藤酮的浓度为 33.35 mg/L 后，Ca^{2+} 浓度开始下降但仍高于对照。这表明该化合物刺激细胞后，胞外的 Ca^{2+} 流入胞内，导致胞内 Ca^{2+} 浓度升高。在高浓度处理时，胞内钙离子浓度反而低于低浓度的处理，这可能是高浓度的该化合物导致钙离子通道或某些酶钝化后钙离子进入量减小，也有可能是高浓度的该化合物导致细胞膜穿孔使部分钙离子流入后又外流的结果。

2.6 12a-羟基鱼藤酮对 PL 细胞细胞膜电位的影响

$DiBAC_4(3)$是一种膜电位敏感的亲脂性阴离子荧光染料，根据其在细胞内外的重新分布可判断细胞膜电位的变化。当 $DiBAC_4(3)$进入细胞内增多，荧光强度增强时，表明细胞膜电位负值减小，即膜电位升高。*t* 测验结果表明，2.5% 丙酮的溶剂对照和空白对照之间的差异不显著($P<0.01$)。正常 PL 细胞处于静息电位时的荧光强度值为 99.88 ± 2.35单位(表 4)。不同浓度的该化合物处理 PL 细胞24 h后，细胞膜电位上升，处于去极化状态。可见，该化合物对 PL 细胞膜电位有影响。

表 3　12a-羟基鱼藤酮处理 24 h 对斜纹夜蛾卵巢细胞周期的影响

Table 3　Effect of 12a-hydroxyrotenone on ovarian cell cycle of *Prodenia litura* at 24 h after treatment

浓度(mg/L) Concentration	在细胞周期中不同时相细胞的分布(%) Cell distribution during different phases of the cell cycle		
	G_0-G_1	S	G_2-M
33.35	20.66 ±0.91	41.94 ±0.42 *	37.40 ±0.30
16.675	18.40 ±0.08	36.51 ±0.06 *	45.09 ±0.71
8.3375	21.84 ±1.01	35.09 ±0.01 *	43.07 ±0.93
4.16875	18.25 ±0.65	40.34 ±0.07 *	41.41 ±0.08
0	22.02 ±0.15	26.13 ±0.21	51.85 ±0.07

表中数据为 4 次重复的平均值 ±*SE*；各浓度对应值分别与 CK 相比(*t* 测验)，* 表示 $P<0.05$。Data in the table are the average of four replications ±*SE*；*：$P<0.05$.

表 4　12a-羟基鱼藤酮处理 24 h 对斜纹夜蛾卵巢细胞细胞膜电位、线粒体膜电位和胞内钙离子浓度的影响

Table 4　Effect of 12a-hydroxyrotenone on cell membrane potential, mitochondrial membrane potential and intracellular free calcium concentration of PL cells at 24 h after treatment

浓度(mg/L) Concentration	钙离子浓度相对值 Relative intracellular free Ca^{2+} concentration	细胞膜电位相对值 Relative cell membrane potential	线粒体膜电位相对值 Relative mitochondrial membrane potential
4.16875	52.27 ±0.28 d	124.97 ±0.16 D	87.44 ±0.68 d
8.3375	56.38 ±0.79 c	141.18 ±0.38 C	116.14 ±0.08 b
16.675	80.42 ±0.03 a	156.94 ±1.14 B	163.26 ±0.95 a
33.35	73.61 ±0.43 b	208.68 ±1.50 A	102.29 ±0.83 c
0	38.27 ±0.56 e	99.98 ±2.35 E	49.86 ±0.97 e

表中数据为 4 次重复的平均值 ±*SE*；同列数据不同大小写分别字母表示在 5% 和 1% 水平上差异显著(DMRT)。Data in the table are the average of four replications ±*SE* and those followed by different capital and lowercase letters within a column are significantly different at the 5% and 1% level (DMRT), respectively.

2.7　12a-羟基鱼藤酮对 PL 细胞线粒体膜电位的影响

经 *t* 测验结果表明，2.5% 丙酮对照和空白对照间的膜电位差异不显著($P<0.01$)，说明 2.5% 的丙酮对该细胞线粒体膜电位影响不显著。从表 4 可知，12a-羟基鱼藤酮对 PL 细胞线粒体的膜电位有显著的影响($P<0.05$)。在浓度 4.16875 ~ 33.35 mg/L 时，线粒体膜电位显著升高，处于去极化状态。

3　讨论

本研究结果表明斜纹夜蛾幼虫取食 12a-羟基鱼藤酮后，其雌虫生殖力显著下降。其原因是：12a-羟基鱼藤酮将斜纹夜蛾卵巢细胞(PL 细胞)的增殖阻滞于细胞周期的 S 期，影响卵巢细胞增殖。同时，该化合物对卵巢细胞具有较弱的毒杀活性，导致一些卵巢细胞死亡。由于上述两方面的原因，卵巢细胞数量逐渐减少导致卵巢管萎缩。由于卵母细胞的活化及持续生长发育依赖于周围其他细胞的营养及旁分泌作用，卵巢管萎缩必然导致卵母细胞不能发育成卵细胞，故其生殖力下降。

3.1　12a-羟基鱼藤酮将 PL 细胞增殖阻滞于 S 期

细胞周期的调控受细胞周期蛋白(cyclin)、成熟促进因子(maturation promoting factor, MPF)和抑素(chalone)等影响(凌诒萍，2001)。由于 cyclin E 的合成始于 G_1 晚期，可与结合蛋白 cdc2 等结合形成具有激酶活性的复合物，该复合物与调节 G_1 期进入 S 期密切相关(张国富等，2005)。本研究确定 12a-羟基鱼藤酮将斜纹夜蛾卵巢细胞增殖阻滞于 S 期，因此，推测 12a-羟基鱼藤酮对细胞周期的影响可能与 cyclin E 和结合蛋白 cdc2 有关；同时还可能与抑制 S 期细胞进入 M 期抑素 M 因子有关。

3.2　12a-羟基鱼藤酮导致 PL 细胞死亡的原因分析

本研究结果表明 12a-羟基鱼藤酮可导致 PL 细

胞死亡。细胞死亡分细胞凋亡和细胞坏死，其中细胞凋亡是一个主动死亡过程，也是一个正常的过程(Azuma *et al*., 2007)。据报道鱼藤酮能诱导多种细胞凋亡(赵黔鲁和柴锡庆，2005；杨芳艳和蒲小平，2006)。鱼藤酮是线粒体复合Ⅰ(Complex Ⅰ)抑制剂(刘祯等，2003)，其抑制线粒体复合Ⅰ后导致线粒体的病理改变。因此，线粒体的病理改变与细胞凋亡的发生密切相关(Kiberstis，1999)。当线粒体发生因病理改变而受损伤时，线粒体膜电位低于正常值(刘祯等，2003)。线粒体膜电位下降是鱼藤酮致细胞凋亡的主要特征(管增伟等，2000；蔡真等，2001)。

该化合物处理 PL 细胞后，细胞膜电位显著升高。这表明因细胞膜通透性改变后膜内外离子浓度已发生变化。胞内钙离子等离子浓度的变化又会影响胞内其他膜电位发生变化，如线粒体膜电位发生变化。从研究结果来看，该化合物处理 PL 细胞后，线粒体膜电位显著高于对照组，这说明 PL 细胞内线粒体没有发生病理改变。由此可见，尽管 12a-羟基鱼藤酮是鱼藤酮类似物，其可能也是线粒体复合Ⅰ抑制剂，但在供试剂量下该化合物并没有导致线粒体膜电位下降而是升高。据此可推测 PL 细胞的线粒体没有发生病理改变。因此，该化合物在本研究中导致 PL 细胞死亡为细胞凋亡的可能性较小。

细胞钙稳态是指细胞在静息状态时，胞内外钙离子浓度存在一个稳定的浓度差。胞内钙离子浓度的变化是细胞维持生理功能的重要物质基础，是信息传递过程中的关键环节。外源化合物导致胞内游离钙离子浓度持续升高，必然会影响内源性化学信号的传递，严重时可使细胞发生中毒性损伤，甚至死亡(何俊等，2004)。本研究结果表明 12a-羟基鱼藤酮导致胞内钙离子浓度显著高于对照组。因此，PL 细胞死亡也可能是由于钙离子导致细胞中毒，细胞膜穿孔等导致细胞坏死。

参 考 文 献(References)

Azuma Y, Higurashi K, Matsumoto K, 2007. Immobilized α2, 6-linked sialic acid suppresses caspase-3 activation during anti-IgM antibody-induced apoptosis in Ramos cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, (1 770): 279 – 285.

Ben Jannet H, Harzallah-Skhiri F, Mighri Z, Simmonds MSJ, Blaney WM, 2000. Responses of *Spodoptera littoralis* larvae to Tunisian plant extracts and to neo-clerodane diterpenoids isolated from *Ajuga pseudoiva* leaves. *Fitoteraoia*, (71): 105 – 112.

Cai Z, Lin MF, Ludwing WL, Karawajew L, 2001. Involvement of mitochondrial membrane potential in the homoharringtonine induced apoptosis of leukemic T-cells. *Chinese Journal of Hematology*, 22 (5): 238 – 240.［蔡真，林茂芳，Wolf-Dieter Ludwing，Leonid Karawajew，2001. 线粒体膜电位在高三尖杉酯碱诱导 T-淋巴细胞白血病细胞 Molt-3 凋亡中的作用. 中华血液杂志，22(5): 238 – 240］

Coll J, Tandrón Y, 2005. Isolation and structure elucidation of three *neo*-clerodane diterpenes from *Teucrium fruticans* L. (Labiatae). *Phytochemistry*, 66(19): 2 298 – 2 303.

Guan ZW, Wang SL, Li Y, Yang YP, Yuan L, Yang JR, Ma SL, Wang QE, 2000. Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in HL-60 cells undergoing apoptosis. *Journal of Hygiene Research*, 29(20): 83 – 86.［管增伟，王盛兰，李勇，杨业鹏，袁兰，杨建如，马士良，王起恩，2000. 凋亡细胞细胞膜和线粒体的动态变化. 卫生研究，29(20): 83 – 86］

He J, Chen JF, Wang YB, Wang XR, 2004. Effect of fenvalerate on the ovarian calcium homeostasis and the serum steroid hormone. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 38(1): 18 – 21.［何俊，陈建锋，刘茹，王玉邦，王心如，2004. 氰戊菊酯对卵巢细胞、组织钙稳态和激素水平的影响. 中华预防医学杂志，38(1): 18 – 21］

Himeji M, Ohtsuki T, Fukazawa H, Tanak M, Yazaki S, Ui S, Nishio K, Yamamoto H, Tasaka K, Mimura A, 2007. Difference of growth-inhibitory effect of *Scutellaria baicalensis*-producing flavonoid wogonin among human cancer cells and normal diploid cell. *Cancer Letters*, (245): 269 – 274.

Jin CH, Zhao KS, 1999. The regulation of polydatin on intracellular free calcium and membrane potential of human vascular smooth muscle cells. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 15(3): 233 – 235.［金春华，赵克森，1999. 虎杖甙对正常人血管平滑肌细胞内钙和膜电位的调节作用. 中国病理生理杂志，15(3): 233 – 235］

Kiberstis PA, 1999. Mitochondria make a comeback. *Science*, (283): 1 482 – 1 488.

Li Y, Chen LS, Peng ZQ, Ju DT, Wan FH, 2007. Effects of host plants on development and fecundity of *Brontispa longissima* (Gestro). *Chinese Journal of Applied Ecology*, 18(9): 2 050 – 2 054.［李亚，程立生，彭正强，鞠端亭，万方浩，2007. 寄主植物对椰心叶甲生长发育和繁殖力的影响. 应用生态学报，18(9): 2 050 – 2 054］

Li YP, Yang HP, Dong ZJ, Le WD, 2005. Effects of rotenone on mitochondrial potential and cell cycles in PC12 cells. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 27(2): 130 – 132.［李云鹏，杨和平，董兆君，乐卫东，2005. 鱼藤酮对 PC12 细胞线粒体膜电位及细胞周期的影响. 第三军医大学学报，27(2): 130 – 132］

Ling YP, 2001. Cell Biology. People's Medical Publishing House, Beijing.［凌诒萍主编，2001. 细胞生物学. 北京：人民卫生出版社］

Liu YQ, Li ZP, Li JC, Gao XY, Yang YD, Gao Q, 1998. Modern Instrumental Analysis. China Agricultural ScienTech Press, Beijing. 28 – 30.［刘约权，李正平，李敬慈，高向阳，杨越冬，高歧，1998. 现代仪器分析. 北京：中国农业科学技术出版社. 28 –

30]

Liu Z, Li WH, Zhang J, Jin P, 2003. The study on cytotoxicity of rotenone to human SH-SY5Y cells *in vitro*. *Journal of Labour Medicine*, 20(2): 73-74. [刘祯, 李卫红, 张杰, 景鹏, 2003. 鱼藤酮对神经瘤细胞线粒体膜电位的影响. 环境与职业医学, 20(2): 73-74]

Lu YJ, Yang SH, Chien CM, Lin YH, Hu XW, Wu ZZ, Wu MJ, Lin SR, 2007. Induction of G2/M phase arrest and apoptosis by a novel enediyne derivative, THDB, in chronic myeloid leukemia (HL-60) cells. *Toxicology in Vitro*, (21): 90-98.

Shen HM, Zhang XH, 2002. Influence of cyhalothrin and fenpropathrin on life-vigor and fecundity of *Tetranychus urticae* Koch. *Acta Phytophylacica Sinica*, 29(2): 183-188. [沈慧敏, 张心虎, 2002. 三氟氯氰菊酯和甲氰菊酯对二点叶螨生命活力及繁殖力的影响. 植物保护学报, 29(2): 183-188]

Song ZM, Xue M, Wang HT, 2007. Effects of six insect growth regulators on the growth, development and reproduction of *Delia antique* (Meigen) (Diptera: Anthomyiidae). *Acta Entomologica Sinica*, 50(8): 775-781. [宋增民, 薛明, 王洪涛, 2007. 六种昆虫生长调节剂对葱蝇生长发育和繁殖力的影响. 昆虫学报, 50(8): 775-781]

Tang QY, Feng MG, 2002. DPS Data Processing System for Practical Statistics. Science Press, Beijing. [唐启义, 冯明光, 2002. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统. 北京: 科学出版社]

Wang MW, Sun XQ, Gu P, Wang YY, Liu L, Cui DS, 2005. Toxicity of rotenone to PC12 cells. *J. Environ. Health*, 22(6): 430-432. [王铭维, 孙秀巧, 顾平, 王彦永, 刘力, 崔东生, 2005. 鱼藤酮对 PC12 细胞的毒性作用. 环境与健康杂志, 22(6): 430-432]

Wang YJ, Hu L, Zhang ZX, Xu HH, Liao MD, Liao SY, 2007. Oxidative damage to *Spodoptera litura* cell induced by α-terthienyl. *Scientia Agricultura Sinica*, 40(7): 1 403-1 409. [王玉建, 胡林, 张志祥, 徐汉虹, 廖美德, 廖绍裕, 2007. α-三联噻酚致斜纹夜蛾 SL 细胞氧化损伤的研究. 中国农业科学, 40(7): 1 403-1 409]

Yang FY, Pu XP, 2006. Protective effect of acteoside on rotenone-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 22(2): 159-164. [杨芳艳, 蒲小平, 2006. 类叶升麻苷对鱼藤酮致 SH-SY5Y 细胞凋亡的保护作用. 中国药理学通报, 22(2): 159-164]

Zhang GF, Li Z, Mo BQ, 2005. Mechanisms of the proliferation of human breast cancer cell MCF-7 by isoflavone genistein. *Food Science*, 26(6): 225-228. [张国富, 李忠, 莫宝庆, 2005. 三羟基异黄酮对人乳腺癌细胞株 MCF-7 增殖的影响机制. 食品科学, 26(6): 225-228]

Zhang RF, Ren YX, Xu HH, Zhang ZX, 2007. Bioactivities of fungicides against *Spodoptera litura* cells and larvae. *Acta Entomologica Sinica*, 50(7): 689-694. [张瑞峰, 任永霞, 徐汉虹, 张志祥, 2007. 杀菌剂对斜纹夜蛾 SL 细胞系和幼虫的生物活性. 昆虫学报, 50(7): 689-694]

Zhao QL, Cai XQ, 2005. Effect of rotenone on Caspase-3, Fas and Fasl and relationship with apoptosis in PC12 cells. *Journal of the Fourth Military Medical University*, 26(20): 1 888-1 891. [赵黔鲁, 柴锡庆, 2005. 鱼藤酮对 PC12 细胞 Caspase-3, Fas 和 Fasl 的作用及与凋亡的关系. 第四军医大学学报, 26(20): 1 888-1 891]

(责任编辑:赵利辉)